

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

01.6.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 4月15日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-144152  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP 2003-144152]

REC'D 22 JUL 2004

WIPO

PCT

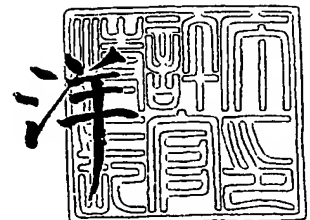
出願人 株式会社クレディアジャパン  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願

【整理番号】 P15-8

【提出日】 平成15年 4月15日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07C 49/00  
C07B 41/06

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県流山市江戸川台西3丁目31番地1号 エステー  
ト江戸川台8棟307号

【氏名】 池田 壽文

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県春日部市浜川戸1丁目14番地4号

【氏名】 外崎 円

【特許出願人】

【識別番号】 501368735

【氏名又は名称】 池田 壽文

【代理人】

【識別番号】 100084696

【弁理士】

【氏名又は名称】 赤尾 直人

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

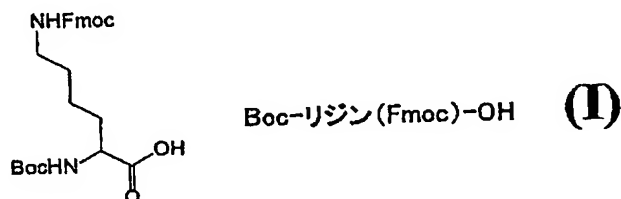
【発明の名称】 新規な機能性ペプチド核酸およびその製法

【特許請求の範囲】

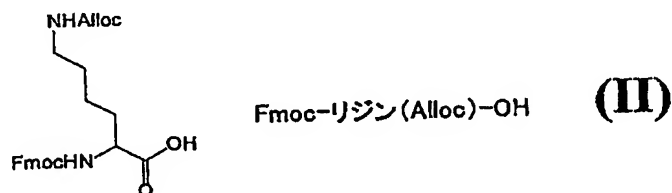
【請求項1】

機能性PNAオリゴマーを製造する方法であって、保護基によって保護されたアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを有するPNAモノマーユニットを、一般式(I)によるBoc-リジン(Fmoc)-OH(尚、Fmocとは9-Fluorenylmethoxycarbonylを示す。)、或いは下記の一般式(II)によるFmoc-リジン(Alloc)-OH(尚、Fmocとは9-Fluorenylmethoxycarbonyl、BocとはtButoxycarbonyl、AllocとはAllyloxycarbonylを示す。)と反応させてPNAオリゴマーを合成した後、該PNAオリゴマーに遊離カルボン酸を有する機能性分子を導入し、さらに前記保護基の脱保護を行うことを含む、前記方法。

【化1】



【化2】



【請求項2】

機能性分子を導入した後に、さらに別異の機能性分子の導入を行うことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

導入される機能性分子が、光応答性機能分子、膜透過性機能分子、臓器選択性

機能分子、殺菌性機能分子、分子破壊性機能分子、癒着性機能性分子、或いは分子認識性機能分子から選択されることを特徴とする、請求項 1～2 のいずれかに記載の方法。

#### 【請求項 4】

導入される機能性分子が、光機能性分子および膜透過性機能分子を含むことを特徴とする、請求項 2 または 3 に記載の方法。

#### 【請求項 5】

光機能性分子が、Cy3、Cy5、Bodipy、pyrene、naphthalimide、naphthalaldiimide、FAM、FITC、ROX、TAMRA または Dabcyl であり、膜透過性機能分子が水溶性アミノ酸誘導体であることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

#### 【請求項 6】

アデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを保護する保護基が、ベンジルオキシカルボニル基 (Z 基) であることを特徴とする、請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

#### 【請求項 7】

PNA オリゴマーの合成が、Boc 法用及び Fmoc 法用固相担体を用いた PNA 鎖における縮合・伸長を含むことを特徴とする、請求項 1～6 のいずれかに記載の方法。

#### 【請求項 8】

Boc 法用固相担体が固相 Boc 法でペプチド合成に使用する methyl benzhydrylamine (MBHA) であることを特徴とする、請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。

#### 【請求項 9】

Fmoc 法用固相担体が MBHA、ポリスチレンをクロロメチル化した樹脂 (Merrifield 樹脂)、4-ヒドロキシベンジルアルコールで修飾した Merrifield 樹脂 (Wang 樹脂)、Boc-アミノ酸-リンカーを結合させたアミノメチル樹脂 (PAM 樹脂)、N-Fmoc-N-メトキシーリンカーを結合させたアミノメチル樹脂 (Weinreb 樹脂)、ポリスチレンに p-

ニトロベンゾフェノンオキシムを結合させた樹脂 (O x i m e 樹脂)、ポリスチレンを利用してトリチル化した樹脂 (T r i t y l 樹脂)であることを特徴とする請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。

#### 【請求項 10】

遊離カルボン酸を有する機能性分子の導入が、B o c 法における F m o c 基をピペリジン処理によって或いは F m o c 法における A l l o c 基を亜鉛酢酸溶液処理によって、選択的に脱保護して得られた 1 級アミノ基との脱水縮合によって行われることを特徴とする、請求項 1～9 のいずれかに記載の方法。

#### 【請求項 11】

下記 a)～d)：

a) B o c-リジン (F m o c) -OH を P N A オリゴマー中に導入する工程において、P N A モノマーユニットを、B o c-リジン (F m o c) -OH と反応させて P N A オリゴマーを製造すること；

b) 前記 P N A オリゴマーから機能性 P N A オリゴマーを製造する工程において、P N A オリゴマーへの機能性分子の導入が、F m o c 基をピペリジン処理によって選択的に脱保護して得られた 1 級アミノ基との脱水縮合によって行われること、の 1 または 2 以上を含むことを特徴とする、請求項 2 に記載の方法；

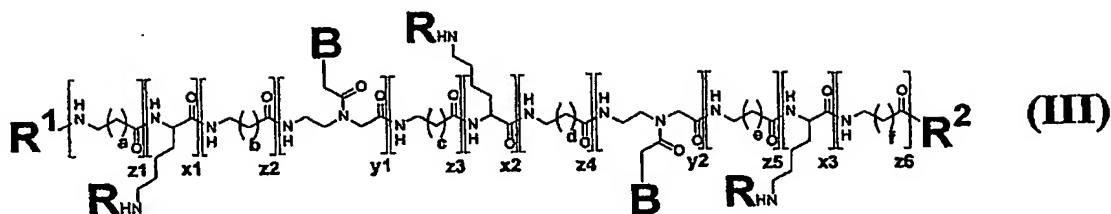
c) F m o c-リジン (A l l o c) -OH を P N A オリゴマー中に導入する工程において、P N A モノマーユニットを、F m o c-リジン (A l l o c) -OH と反応させて P N A オリゴマーを製造すること；および

d) 前記 P N A オリゴマーから機能性 P N A オリゴマーを製造する工程において、P N A オリゴマーへの機能性分子の導入が、A l l o c 基を亜鉛酢酸溶液処理によって選択的に脱保護して得られた 1 級アミノ基との脱水縮合によって行われること、の 1 または 2 以上を含むことを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

#### 【請求項 12】

下記の一般式 (I I I)

## 【化 3】



(式中、Bは、互いに独立し、同一または異なって、アデニン、グアニン、シトシンまたはチミンであり、Rは、互いに独立し、同一または異なって、Fmoc基または機能性カルボン酸誘導体であり、 $R^1$ は、水素原子または機能性カルボン酸誘導体であり、 $R^2$ は、水素原子、アミノ基、水酸基、チオール基を含む誘導体または機能性カルボン酸誘導体であり、 $a \sim f$ は $0 \sim \infty$ の整数であり、 $X_1 \sim X_3$ 、 $Y_1$ 、 $Y_2$ および $Z_1 \sim Z_6$ はいずれも0以上の整数であり、 $X_1 + X_2 + X_3 \geq 0$ であり、 $Y_1 + Y_2 > 0$ であり、 $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 \geq 0$ である。ただし、 $X_1 + X_2 + X_3$ および $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5$ が同時に0であることはなく、 $X_1 + X_2 + X_3 = 0$ の場合、 $R^1$ は機能性カルボン酸誘導体である。)で表される化合物。

## 【請求項 13】

$X_1 + X_2 + X_3 = 3$ であり、 $Y_1 + Y_2 = 15$ であることを特徴とする、請求項 12 に記載の化合物。

## 【請求項 14】

$X_1 = 3$ であり、 $Y_1 = 15$ であることを特徴とする、請求項 13 に記載の化合物。

## 【請求項 15】

R または  $R^1$  が細胞膜透過性機能分子誘導体であることを特徴とする、請求項 14 に記載の化合物

## 【請求項 16】

$R^1$  が機能性カルボン酸誘導体であることを特徴とする、請求項 15 に記載の化合物。

## 【請求項 17】

$X_1 = Z_1 = 1$ であることを特徴とする、請求項 15 または 16 に記載の化合物

物。

【請求項 18】

$Y_1 \geq 2$  であり、 $Z_2 = 1$  であることを特徴とする、請求項 15～17 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 19】

$a \leq 6$  であり、 $b \leq 4$  であり、 $f \leq 6$  であることを特徴とする、請求項 15～18 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 20】

$R^1$  が光機能性カルボン酸誘導体であることを特徴とする、請求項 15～19 のいずれかに記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、リジンを使用した機能性ペプチド核酸オリゴマーおよびその中間体の新規な製造方法に関する。

【0002】

【従来技術】

核酸は生物の遺伝情報を司る DNA および RNA である。これに対して、ペプチド核酸 (PNA) とは、核酸の糖リン酸骨格を N-(2-アミノエチル) グリシン骨格に変換した修飾核酸である (図 1)。DNA/RNA の糖リン酸骨格は中性条件で負電荷を帯びていて相補鎖間の静電的な反発があるが、PNA の背骨構造はもともと電荷を持たないので静電的な反発がない。そのため PNA は従来の核酸と比較して、高い二重鎖形成能をもち、高い塩基配列認識能を持つ。さらに PNA は生体内ヌクレアーゼ・プロテアーゼに対し非常に安定で分解されないため、アンチセンス分子として遺伝子治療に応用することが検討されている。

【0003】

従来の DNA を媒体にしていた技術を PNA 化することにより、これまで克服できなかった DNA の欠点を補うことが可能となった。例えば、遺伝情報の体系的な解析を高速に且つ大量に行うための「DNA マイクロアレイ技術」および塩

基配列を特異的に認識したことを蛍光発光により検出できるプローブとして最近開発された「モレキュラービーコン」に応用することが可能である。これらはいずれも酵素耐性に乏しいDNAを媒体とするため、これらの技術を用いるに際しては厳密なサンプリングが要求される。この要求を満たすことが、前記の技術を高度化する上での鍵となっている。

#### 【0004】

一方PNAは酵素に対し完全な耐性を持つので、DNAマイクロアレイ技術およびモレキュラービーコンにおいてPNAをDNAに代用することによって、前記技術の欠点が克服され、さらに長所が引き出されるものと期待されている。

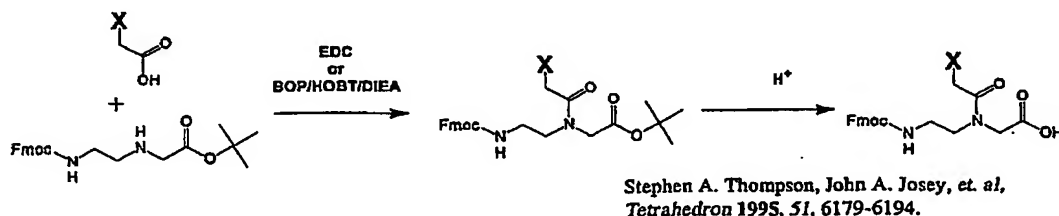
DNAマイクロアレイ技術およびモレキュラービーコン以外にもPNA化することにより発展が期待される分野は数多いが、それらにおいてはPNAの効率的な機能化、すなわちPNAモノマーへの機能性分子の効率的な導入による新規なPNAモノマーの設計が必要である。

#### 【0005】

PNAオリゴマーの合成方法には通常、固相ペプチド合成法を用いるので、PNAモノマーユニットをPNAの背骨構造によって分類すると、Fmoc型PNAモノマーユニットとBoc型PNAモノマーユニットの2種類が含まれる(図2)。

Fmoc型PNAモノマーユニットの合成方法は既に確立されており、しかもそのオリゴマーの合成は一般的なDNA自動合成機によって可能であるため、下記のルート

#### 【化4】



(Xはグアニン、チミン、シトシンまたはアデニンを表す)

によって、少量スケールでの合成が可能となっている。

なお、Fmocとは9-Fluorenylmethoxycarbonyl

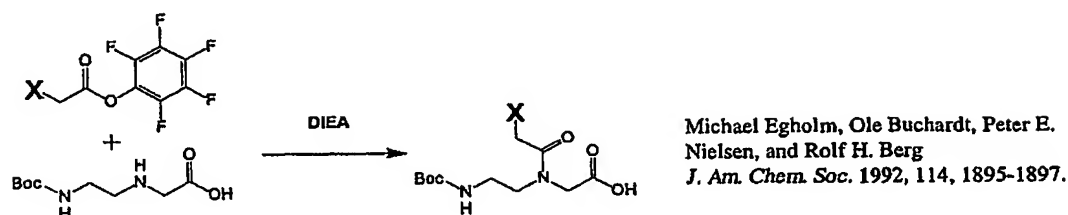


、BocとはtButoxycarbonyl、AllocとはAllyloxycarbonylを指す。

### 【0006】

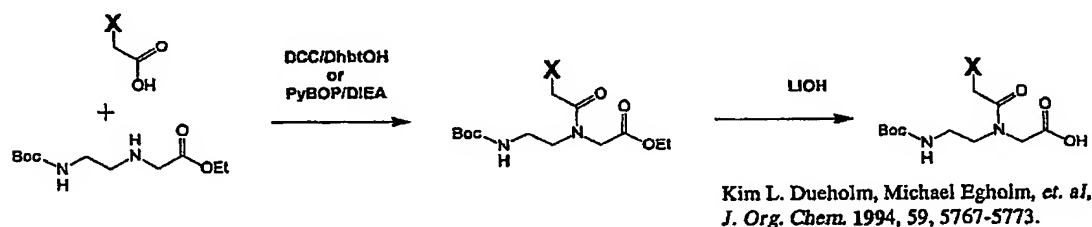
当初PNAには下記のようなBoc型PNAモノマーユニット

### 【化5】



が採用され、その後より効率のよい合成方法

### 【化6】



が確立された。しかし、前述したように取り扱いが容易なFmoc型が開発されたため、Boc型の使用頻度は減少している。

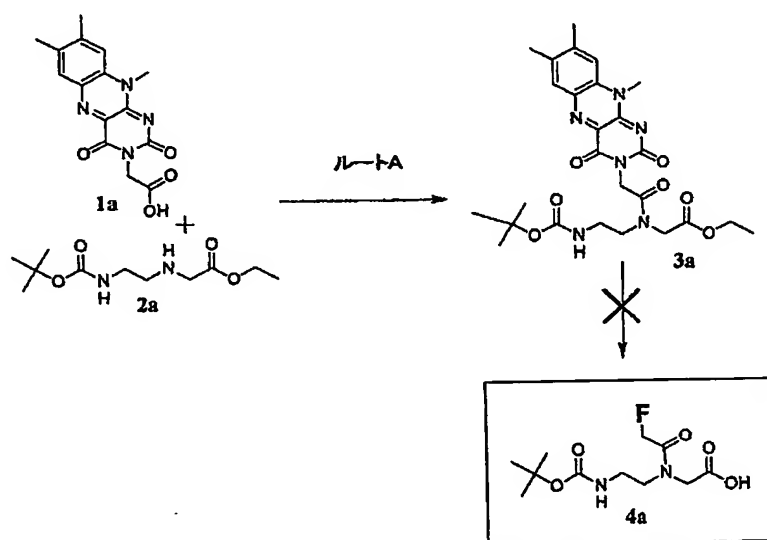
しかし、グアニン・チミン・シトシン・アデニン4種類の核酸塩基以外の機能性分子を導入する際、例えば光機能性分子を導入する際には、導入する機能性分子がアルカリ条件に不安定な場合が多いので、アルカリ条件を使用しないBoc型PNA背骨構造の有用性は高い。「t-ブトキシカルボニルアミノエチルアミン及びアミノ酸誘導体の製造方法」に関しては、本発明者らが特願2000-268638として既に特許出願中である。

### 【0007】

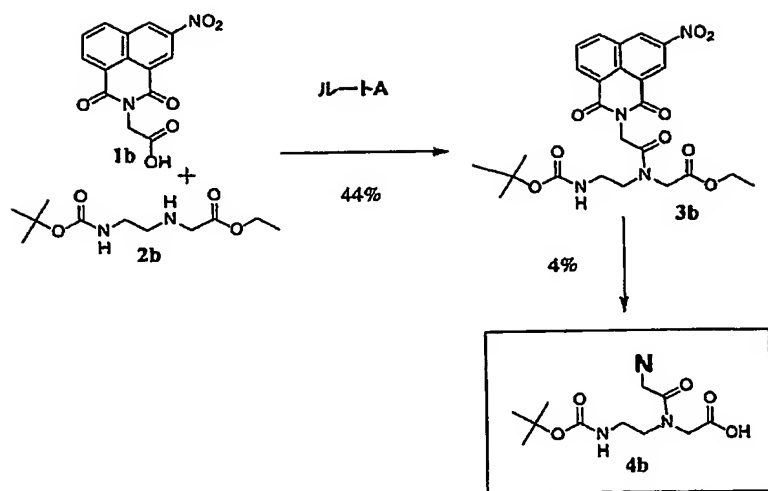
これ以外にも、光機能性オリゴPNAのモノマーユニットの合成例は過去に5例が知られている。これら全てが上記ルートを用いているが、その収率については記載がないか、または極めて低いものでしかない (Peter E. Nielsen, Gerald Haaiman, Anne B. Eldrup PCT Int. Appl. (1998) WO 985295 A1 1998112

6, T. A. Tran, R. -H. Mattern, B. A. Morgan (1999) J. Pept. Res, 53, 134-145, Jesper Lohse et al. (1997) Bioconjugate Chem., 8, 503-509, Hans-georg Batz, Henrik Frydenlund Hansen, et al. Pct Int. Appl. (1998) WO 9837232 A2 19980827, Bruce Armitage, Troels Koch, et al. (1998) Nucleic Acid Res., 26, 715-720)。また、用いられる化合物の構造がアルカリ性条件に比較的安定であることが特徴的であるため、アルカリ性条件に不安定な発色団が付くと、前記従来法と類似の方法、すなわち下記ルートA

## 【化7】



## 【化8】



では効率良く合成できないと予想された。

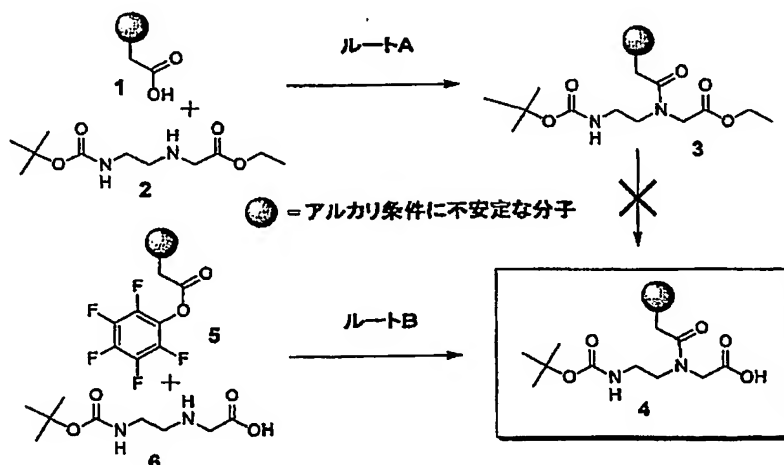
## 【0008】

したがって、一般に光機能性分子等の機能性分子は高価な場合が多いため、より合目的な機能性PNAの合成方法、すなわち、①機能性PNAモノマーユニットの設計における、機能性分子のPNA背骨構造への効率的な導入、②コストパフォーマンスを考えた合成ルート、および③遺伝子診断薬としての応用へ適応させるための、これらの機能性分子を超高速に導入する方法が探求された。

## 【0009】

上記課題に鑑み、本発明者らは、機能性PNAモノマーの新規製造方法として、下記ルートB

## 【化9】



に示すように、PNA背骨構造に $\alpha$ -ブトキシカルボニルアミノエチルアミン誘導体6を用いて1のペンタフルオロフェニル基を含む活性エステル体5と縮合してほぼ定量的に光機能性PNAモノマー4を合成する方法を見出した。

#### 【0010】

また、本発明者らは、機能性PNAモノマーを合成する別法として、PNA背骨構造に上記 $\alpha$ -ブトキシカルボニルアミノエチルアミン誘導体6の代わりにベンジルオキシカルボニル- $\omega$ -アミノ酸誘導体を用いる方法（ルートC）を見出した。これらの方法については、既に特許出願がなされている。

#### 【0011】

したがって、最終的に機能性PNAを合成するための方法として、上記ルートBおよびルートCのいずれかを用いる方法によって機能性PNAモノマーを合成した後に、それらを重合する方法が工業的にも確立されつつある。すなわち、現在までの機能性PNAの合成法によってPNAブロープとして用いられる機能性PNAを工業的に大量合成することは可能になりつつある。

#### 【0012】

一方、コストパフォーマンスの向上および機能性分子を超高速に導入することを目的とした、機能性PNAを合成方法の改良もなされている。例えば、前記機能性PNAモノマーユニットを用いる方法とは異なるアプローチとして、下記の前駆体的PNAモノマーユニットを利用することによって、ポスト合成的に機能性分子をPNAオリゴマーに導入する方法が報告されている（Oliver Seitz; Tetrahedron Letters 1999, 40, 4161-4164.）。

#### 【化10】



#### 【0013】

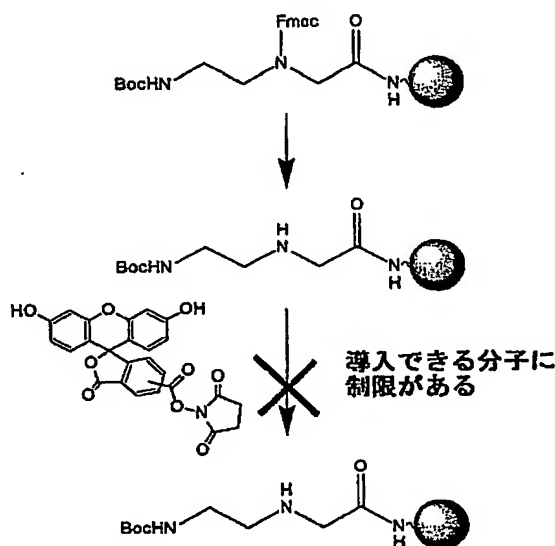
当該方法は、前記前駆体的PNAモノマーユニットをPNAオリゴマーに導入した後、さらに機能性分子を導入することによって機能性PNAを合成するものである。

しかし、当該方法においては、導入できる機能性分子の種類が限定される等の欠点がある。

#### 【0014】

例えば、下図に示すように、市販されている光機能性分子の succinimide エステルを導入することはできず、導入するためには Fmoc-Gly 等のリンカーをまず導入する必要があるが、結果として上記化合物は使用しにくいものになっている。

#### 【化11】



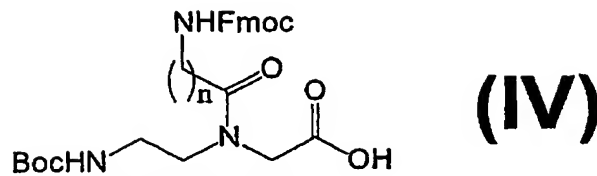
#### 【0015】

ところが、本発明者らは、前駆体的 PNA モノマーユニットの構造を最適化することによって、驚くべきことに、従来法における前記課題を克服し、コストパフォーマンスに優れ、かつ機能性分子を超高速に導入することができる、極めて広範にわたる機能性 PNA を合成できることを見出した。

#### 【0016】

すなわち、保護基によって保護されたアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを有する PNA モノマーユニットを、下図に示す Fmoc- $\omega$ -アミノ酸-BocPNA-OH (IV) と反応させて PNA オリゴマーを合成した後、該 PNA オリゴマーに遊離カルボン酸を有する機能性分子をポスト合成的に導入することに成功した。

## 【化12】



(式中、nは1～15までの整数を表す)

## 【0017】

前記合成方法は、機能性分子を導入した後に、さらに別異の機能性分子の導入を行うことができる。また、導入される機能性分子が、光応答性機能分子、膜透過性機能分子、臓器選択性機能分子、殺菌性機能分子、分子破壊性機能分子、癒着性機能性分子、或いは分子認識性機能分子から選択されることを特徴とする。

## 【0018】

また、導入する機能性分子として市販のsuccinimideエステルを使用する必要がなく、カルボン酸を有する化合物であれば問題なく利用でき且つ定量的に導入できるので、前記合成方法はコストパフォーマンスに極めて優れている。

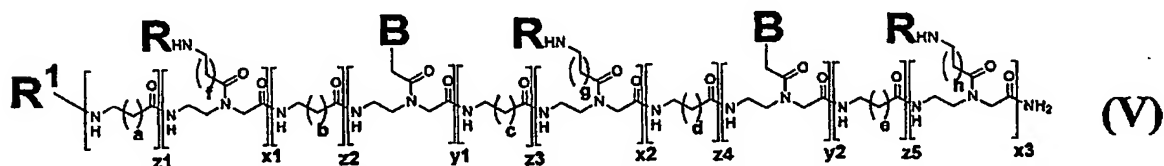
## 【0019】

さらに、前記前駆体的PNAモノマーユニットを機能性PNAオリゴマーに導入した後にレジンを分割することにより、それぞれのレジンに異なった機能性分子を導入することができるので、極めて高速な機能性PNAオリゴマーの合成手法を開発することが可能となる。

## 【0020】

この方法によって効率的な合成が可能になる機能性PNAオリゴマーの例として、下記一般式(V)

## 【化13】



(式中、Bは、互いに独立し、同一または異なって、アデニン、グアニン、シト

シンまたはチミンであり、Rは、互いに独立し、同一または異なって、Fmoc基または機能性カルボン酸誘導体であり、 $R^1$ は、水素原子または機能性カルボン酸誘導体であり、 $a \sim h$ は0～10の整数であり、 $X_1 \sim X_3$ 、 $Y_1$ 、 $Y_2$ および $Z_1 \sim Z_5$ はいずれも0以上の整数であり、 $X_1 + X_2 + X_3 \geq 0$ であり、 $Y_1 + Y_2 > 0$ であり、 $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 \geq 0$ である。ただし、 $X_1 + X_2 + X_3$ および $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5$ が同時に0であることはなく、 $X_1 + X_2 + X_3 = 0$ の場合、 $R^1$ は機能性カルボン酸誘導体である。)で表される化合物において、 $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 = 0$ であり、 $R^1$ が水素原子である化合物を挙げることができる。

#### 【0021】

ところで、細胞中に導入するためのに蛍光プローブとして、これまでDNAオリゴマー・RNAオリゴマー・PNAオリゴマーが利用されているが、これらを細胞中に導入するためには、当然ながら細胞膜を通過させなければならない。しかし、細胞膜は膜表面が負電荷を帯びているため、元々負に帯電しているDNA/RNAオリゴマーを導入するのは非常に困難である。

#### 【0022】

一方PNAオリゴマーは電氣的に中性であるが、膜透過しにくいという結果が得られている。したがって、PNAオリゴマーを細胞内に導入するに際しては、膜表面を前処理してその導入をしやすくしたり、あるいはトランスフェクション試薬を用いて導入せざるを得ないのが現状である。

#### 【0023】

しかし、そのような処理を施してPNAオリゴマーを導入した場合においてプローブの機能が発揮されたとしても、本来生体が示す挙動を正確に表現していることは必ずしも保証されない。しかも、これは細胞1個の場合であり、多細胞(個体)での利用に至っては到底不可能である。

このような現状および観点から、膜透過性機能を有する蛍光PNAプローブの開発が有用であると考えられている。

#### 【0024】

なお、膜透過性機能を有する蛍光PNAプローブは既に存在する。例えば、①

膜透過性機能を有するオリゴペプチドをPNAに結合させたもの、②膜透過性機能を有するリン脂質をPNAに結合させたものが挙げられる。しかしながら、これらは膜透過した後細胞内においてプロテアーゼ等の酵素によりPNA以外の部分が分解され、細胞内に滞留してしまうことが予想される。このことは、ターゲットを捕捉出来なかった過剰なPNAプローブが膜透過性機能を失い、その後の洗浄過程で細胞外に出にくくなることにつながるため、本来細胞が持っている遺伝子発現系を正確に表現できないことを意味する。

#### 【0025】

ところが、本発明者らは、Fmoc- $\omega$ -アミノ酸-BocPNA-OHを含有した前駆体的PNAオリゴマーを用いて、膜透過性機能を有するアミノ酸誘導体をポスト合成的に導入することにより、煩雑な前処理・後処理を含まない、すなわち生きた細胞をそのまま用いて遺伝子発現系を正確に分析できる新規蛍光PNAプローブの設計に成功した。

#### 【0026】

しかし、この前駆体的PNAオリゴマーはFmoc- $\omega$ -アミノ酸-BocPNA-OHのみが有効であるわけではなく、必須アミノ酸であるリジン誘導体でもその役割を代行することが可能で、扱いやすさ・入手のしやすさを考慮に入れた新規蛍光PNAプローブの設計が今後必要になると予想される。

#### 【0027】

##### 【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明は、コストパフォーマンスに優れ、かつ機能性分子を超高速に導入することができる、機能性PNAの新規合成方法およびそれに用いる化合物、ならびに新規機能性PNAを提供することを目的とする。

#### 【0028】

##### ・【課題を解決するための手段】

上記課題に鑑み研究を重ねた結果、本発明者らは、前駆体的PNAモノマーユニットの構造を最適化することによって、驚くべきことに、従来法における前記課題が克服され、かつ極めて広範にわたる機能性PNAを合成できることを見出し、以下のような本発明を完成するに至った。



## 【0029】

(1) . 機能性PNAオリゴマーを製造する方法であって、保護基によって保護されたアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを有するPNAモノマーユニットを、一般式 (I) によるBoc-リジン (Fmoc)-OH (尚、Fmocとは9-Fluorenylmethoxycarbonylを示す。)、或いは下記の一般式 (II) によるFmoc-リジン (Alloc)-OH (尚、Fmocとは9-Fluorenylmethoxycarbonyl、BocとはtButoxycarbonyl、AllocとはAllyloxycarbonylを示す。) と反応させてPNAオリゴマーを合成した後、該PNAオリゴマーに遊離カルボン酸を有する機能性分子を導入し、さらに前記保護基の脱保護を行うことを含む、前記方法。

## 【0030】

(2) . 機能性PNAオリゴマーを製造する方法は、機能性分子を導入した後に、さらに別異の機能性分子の導入を行うことを特徴とする前記 (1) の方法。

## 【0031】

(3) . 導入される機能性分子が、光応答性機能分子、膜透過性機能分子、臓器選択性機能分子、殺菌性機能分子、分子破壊性機能分子、癒着性機能性分子、或いは分子認識性機能分子から選択されることを特徴とする前記 (1) の方法。

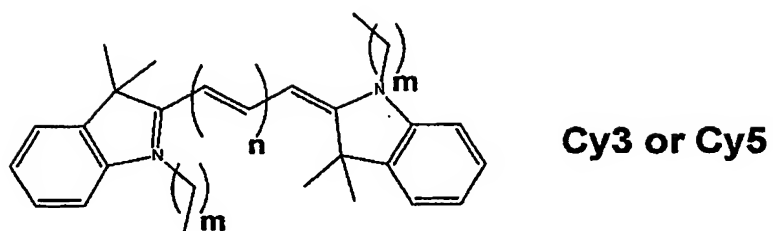
## 【0032】

(4) . 導入される機能性分子が、光機能性分子および膜透過性機能分子を含むことを特徴とする前記 (2) 、(3) の方法。

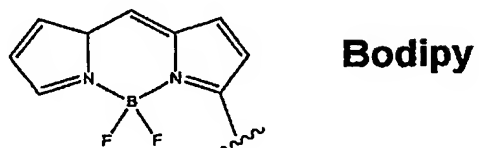
## 【0033】

(5) . 光機能性分子が、下記のCy3、Cy5、Bodipy、pyrene、naphthalimide、naphthaldiimide、FAM、FITC、ROX、TAMRAまたはDabcylであり、膜透過性機能分子が水溶性アミノ酸誘導体であることを特徴とする前記 (4) の方法。

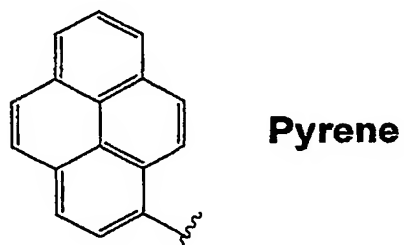
【化14】



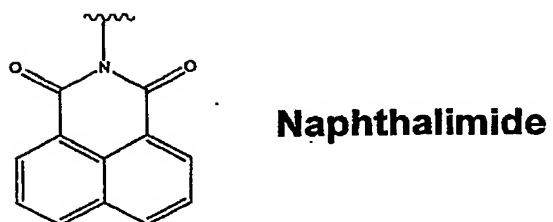
【化15】



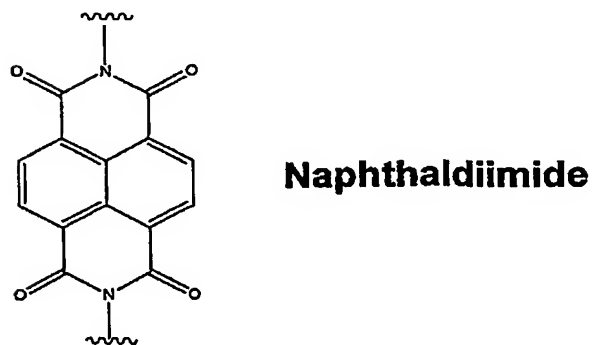
【化16】



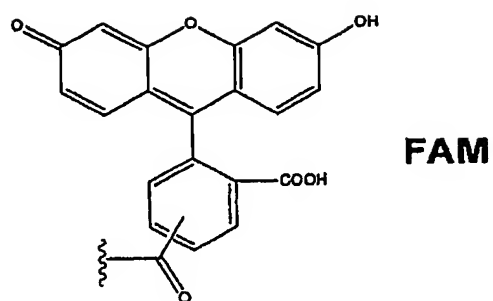
【化17】



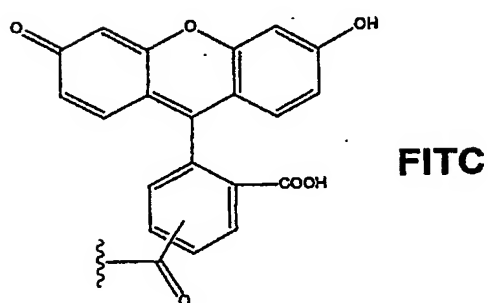
【化18】



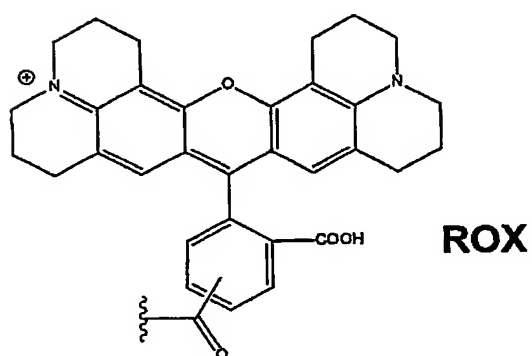
【化19】



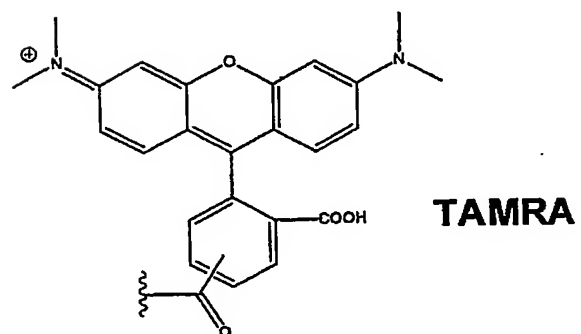
【化20】



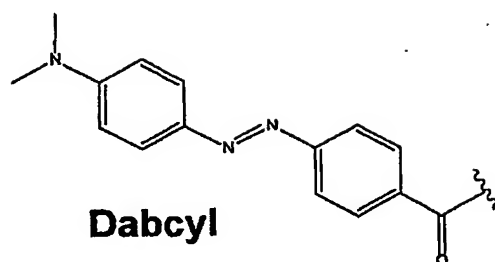
【化21】



【化22】



## 【化23】



## 【0034】

(6) . アデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを保護する保護基が、ベンジルオキシカルボニル基 (Z 基) であることを特徴とする前記 (1) ~ (5) のいずれかの方法。

## 【0035】

(7) . PNAオリゴマーの合成が、Boc 法用及び Fmoc 法用固相担体を用いた PNA 鎖における縮合・伸長を含むことを特徴とする前記 (1) ~ (6) のいずれかの方法。

## 【0036】

(8) . Boc 法用固相担体が固相 Boc 法でペプチド合成に使用する methyl benzhydrylamine 樹脂 (MBHA) であることを特徴とする、前記 (1) ~ (7) のいずれかに記載の方法。

## 【0037】

(9) . Fmoc 法用固相担体が MBHA、ポリスチレンをクロロメチル化した樹脂 (Merrifield 樹脂)、4-ヒドロキシベンジルアルコールで修飾した Merrifield 樹脂 (Wang 樹脂)、Boc-アミノ酸-リンカーを結合させたアミノメチル樹脂 (PAM 樹脂)、N-Fmoc-N-メトキシーリンカーを結合させたアミノメチル樹脂 (Weinreb 樹脂)、ポリスチレンに p-ニトロベンゾフェノンオキシムを結合させた樹脂 (Oxime 樹脂)、ポリスチレンを利用してトリチル化した樹脂 (Trityl 樹脂) であることを特徴とする前記 (1) ~ (7) のいずれかに記載の方法。

## 【0038】

(10) . 遊離カルボン酸を有する機能性分子の導入が、Boc 法における F

moc基をピペリジン処理によって或いはFmoc法におけるAlloc基を亜鉛酢酸溶液処理によって、選択的に脱保護して得られた1級アミノ基との脱水縮合によって行われることを特徴とする前記(1)～(9)のいずれかに記載の方法。

### 【0039】

(11). 下記a)～d):

a) Boc-リジン(Fmoc)-OHをPNAオリゴマー中に導入する工程において、PNAモノマーユニットを、Boc-リジン(Fmoc)-OHと反応させてPNAオリゴマーを製造すること;

b) 前記PNAオリゴマーから機能性PNAオリゴマーを製造する工程において、PNAオリゴマーへの機能性分子の導入が、Fmoc基をピペリジン処理によって選択的に脱保護して得られた1級アミノ基との脱水縮合によって行われること、の1または2以上を含むこと;

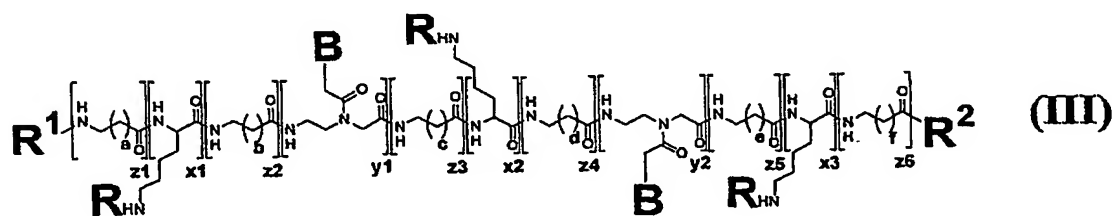
c) Fmoc-リジン(Alloc)-OHをPNAオリゴマー中に導入する工程において、PNAモノマーユニットを、Fmoc-リジン(Alloc)-OHと反応させてPNAオリゴマーを製造すること; および

d) 前記PNAオリゴマーから機能性PNAオリゴマーを製造する工程において、PNAオリゴマーへの機能性分子の導入が、Alloc基を亜鉛酢酸溶液処理によって選択的に脱保護して得られた1級アミノ基との脱水縮合によって行われること、の1または2以上を含むことを特徴とする前記(2)記載の方法。

### 【0040】

(12). 下記一般式(III)

【化24】



(式中、Bは、互いに独立し、同一または異なって、アデニン、グアニン、シトシンまたはチミンであり、Rは、互いに独立し、同一または異なって、Fmoc

基または機能性カルボン酸誘導体であり、 $R^1$ は、水素原子または機能性カルボン酸誘導体であり、 $R^2$ は、水素原子、アミノ基、水酸基、チオール基を含む誘導体または機能性カルボン酸誘導体であり、 $a \sim f$ は $0 \sim \infty$ の整数であり、 $X_1 \sim X_3$ 、 $Y_1$ 、 $Y_2$ および $Z_1 \sim Z_6$ はいずれも0以上の整数であり、 $X_1 + X_2 + X_3 \geq 0$ であり、 $Y_1 + Y_2 > 0$ であり、 $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 \geq 0$ である。ただし、 $X_1 + X_2 + X_3$ および $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5$ が同時に0であることはなく、 $X_1 + X_2 + X_3 = 0$ の場合、 $R^1$ は機能性カルボン酸誘導体である。)で表される化合物。

**【0041】**

(13) .  $X_1 + X_2 + X_3 = 3$ であり、 $Y_1 + Y_2 = 15$ であることを特徴とする、前記(12)記載の化合物。

**【0042】**

(14) .  $X_1 = 3$ であり、 $Y_1 = 15$ であることを特徴とする、前記(13)記載の化合物。

**【0043】**

(15) .  $R$ または $R^1$ が細胞膜透過性機能分子誘導体であることを特徴とする、前記(14)記載の化合物。

**【0044】**

(16) .  $R^1$ が機能性カルボン酸誘導体であることを特徴とする、前記(15)記載の化合物。

**【0045】**

(17) .  $X_1 = Z_1 = 1$ であることを特徴とする、前記(15)または(16)記載の化合物。

**【0046】**

(18) .  $Y_1 \geq 2$ であり、 $Z_2 = 1$ であることを特徴とする、前記(15)～(17)のいずれかに記載の化合物。

**【0047】**

(19) .  $a \leq 6$ であり、 $b \leq 4$ であり、 $f \leq 6$ であることを特徴とする、前記(15)～(18)のいずれかに記載の化合物。

## 【0048】

(20).  $R^1$ が光機能性カルボン酸誘導体であることを特徴とする、前記(15)～(19)のいずれかに記載の化合物。

## 【0049】

本発明は、Boc-リジン(Fmoc)-OH或いはFmoc-リジン(Alloc)-OHをPNAオリゴマーに導入した後、機能性分子をポスト合成的に導入することにより、ほぼ定量的に光機能性PNAオリゴマーを合成できることに成功したものである。

尚、Fmoc、Boc、Allocの各趣旨については、既に段落【0029】において示した通りである。

## 【0050】

上記特徴により、本発明の製造方法においては、導入する機能性分子として市販のsuccinimideエステルを使用する必要がなく、カルボン酸を有する化合物であれば問題なく利用でき且つ定量的に導入できる。そのため、本発明による製造方法はコストパフォーマンスに極めて優れている。

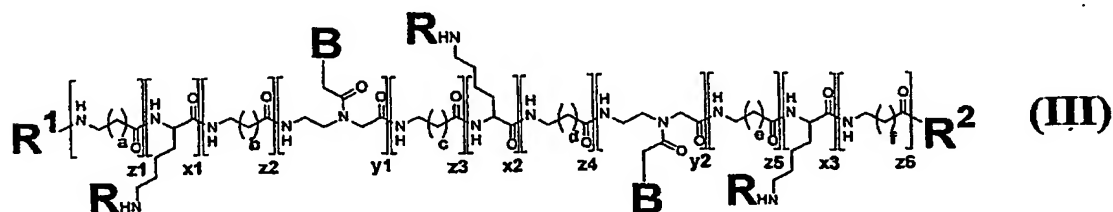
## 【0051】

また、前記前駆体的PNAモノマーユニットを機能性PNAオリゴマーに導入した後にレジンを分割することにより、それぞれのレジンに異なった機能性分子を導入することができる。したがって、本発明による製造方法によれば、極めて高速な機能性PNAオリゴマーの合成手法を開発することが可能となる。

## 【0052】

本発明の方法によって効率的な合成が可能になる機能性PNAオリゴマーの例として、下記一般式(III)

## 【化25】



(式中、Bは、互いに独立し、同一または異なって、アデニン、グアニン、シト

シンまたはチミンであり、Rは、互いに独立し、同一または異なって、Fmoc基または機能性カルボン酸誘導体であり、 $R^1$ は、水素原子または機能性カルボン酸誘導体であり、 $R^2$ は、水素原子、アミノ基、水酸基、チオール基を含む誘導体または機能性カルボン酸誘導体であり、 $a \sim f$ は $0 \sim \infty$ の整数であり、 $X_1 \sim X_3$ 、 $Y_1$ 、 $Y_2$ および $Z_1 \sim Z_6$ はいずれも0以上の整数であり、 $X_1 + X_2 + X_3 \geq 0$ であり、 $Y_1 + Y_2 > 0$ であり、 $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 \geq 0$ である。ただし、 $X_1 + X_2 + X_3$ および $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5$ が同時に0であることはなく、 $X_1 + X_2 + X_3 = 0$ の場合、 $R^1$ は機能性カルボン酸誘導体である。)で表される化合物において、 $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 = 0$ であり、 $R^1$ が水素原子である化合物を挙げることができる。

#### 【0053】

本発明によれば、前記一般式(I)で表される化合物において同一または異なる機能性分子を、任意の複数の位置に導入することも可能となる。すなわち、前記前駆体的PNAモノマーユニットsを用いてPNAオリゴマーを導入した後、ピペリジン処理或いは亜鉛酢酸溶液処理のいずれかと機能性分子のポスト合成的導入を一括して行うことによるものであるが、これはPNAオリゴマーの細胞膜透過機能を向上させるアンテナペディアを高速に設計する上で、欠かせないものである。この点においても、本発明による方法は極めて優れたものである。

#### 【0054】

このように製造される化合物の例として、前記一般式(I)において、 $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 > 0$ であり、Rが細胞膜透過性分子誘導体であり、 $R^1$ が機能性カルボン酸誘導体であるものが挙げられる。

#### 【0055】

このプローブは大きく蛍光標識領域・細胞膜透過性機能領域・分子認識領域の3つに分けることができ、それぞれをリンカー部位( $Z_1 \sim Z_5$ の添字付きで表される部分)を介して結合させた形をしている。

蛍光標識化合物は市販のものも、既に本発明者らがPCT出願を行った新規蛍光標識化PNAモノマーユニットも用いることができる。

#### 【0056】



分子認識部位は市販のPNAユニットを用いて合成する。このものの特徴は、機能性分子をポスト合成的に導入するために前駆体ユニットとしてBoc-リジン(Fmoc)-OH或いはFmoc-リジン(Alloc)-OHを膜透過性機能領域部に用いていることである。該前駆体ユニットは市販されており、これを複数個並べて導入した後、前記したように同一機能性分子を一括導入できることを特徴としている。

#### 【0057】

したがって、本発明によれば、光機能性分子に限定されることない、多種多様な機能性分子を、PNA中に容易かつ極めて効率的に導入することができるようになる。

このような機能性分子として、Cy3型、Cy5型、Bodipy型、Naphthalimide型、Naphthalaldimide型、Flavin型、Dabcyl型、Biotin型、FAM型、Rhodamine型、TAMRA型、ROX型、HABA型、Pyrene型、Coumarine型等の光機能性モノマーユニット、膜透過性機能分子、臓器選択性機能分子、殺菌性機能分子、分子破壊性機能分子、癒着性機能性分子、或いは分子認識性機能分子等が挙げられる。

#### 【0058】

すなわち、本発明における「機能性」の語は、光機能性のみならず、膜透過性、臓器選択性、殺菌性、分子破壊性、癒着性、或いは分子認識性等を含む、ある特定の修飾を行うことによって化合物に新たに付与される種々の機能の全てを意味するものである。

さらに、本発明における「機能性PNA」の語は、PNAモノマー同士が2-(N-アミノエチル)グリシン骨格によって直接結合したもののみならず、その間にリンカーとしての炭化水素鎖と機能性分子を導入する前駆体的なリジン骨格等を含むものも意味するものである。

#### 【0059】

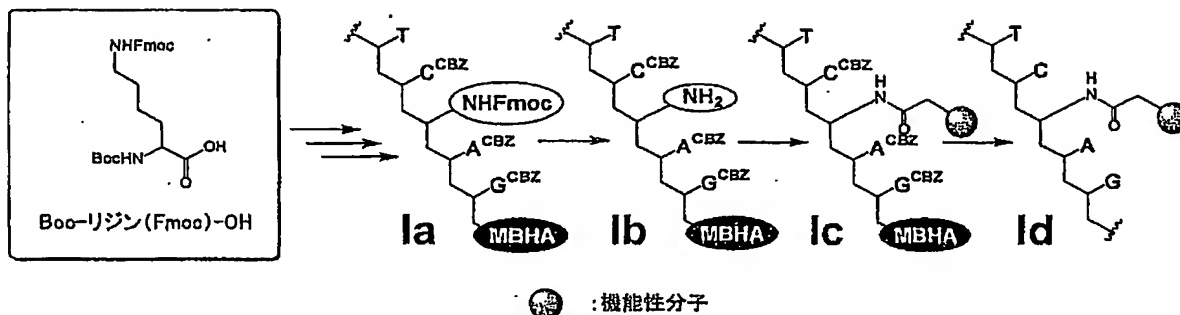
##### 【発明の実施の形態】

ここで、本発明による方法の特徴を更に詳細に説明する。

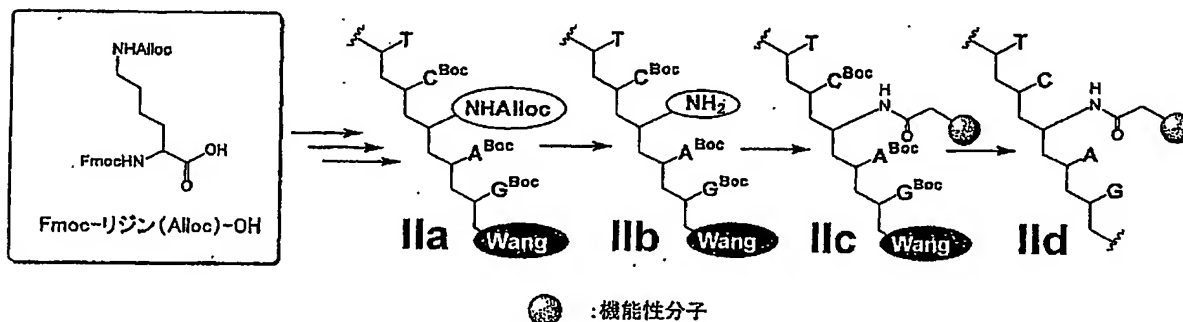
## 【0060】

本発明によるオリゴPNAを合成するルートは、典型的には、下図

## 【化26】



## 【化27】



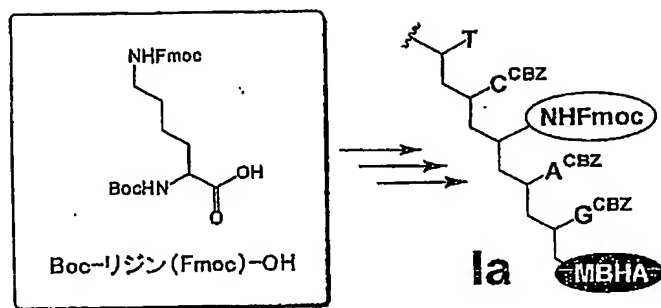
に示すとおりである。

尚、MBHAは、固相Bocでペプチド合成に使用するmethylbenzhydrylamine樹脂のことであり、Wangは、4-ヒドロキシベンジルアルコールで修飾したMerrifield樹脂のことであり、これらについては、【0036】、または【0037】において述べた通りである。

## 【0061】

次に、【化26】に関わる製造工程のうち、下図

## 【化28】



に示すように、Boc-リジン (Fmoc)-OHを用いて、オリゴマー Ia を合成する。具的には、Z 基 (N-ベンジルオキシカルボニル基) 等で保護されたアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを有する PNA モノマーユニットを、前駆体的 PNA モノマーユニットと反応させ、Boc 法用固相担体を用いて PNA 鎖を逐次縮合・伸長せしめる。

## 【0062】

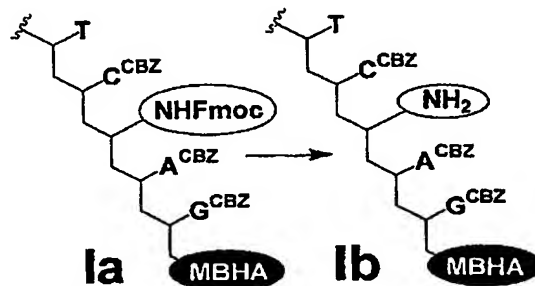
PNA 鎖の縮合においては、予め Boc 基を脱離しておく必要があるが、その方法に制限はなく、一般的な方法が用いられる。それに続く縮合には、HATU、HBTU および BOP 等の一般的な縮合剤が用いられる。

また、固相担体に関しては、Boc 法用のものであれば特に制限はないが、特に MBHA が好適に用いられる。

## 【0063】

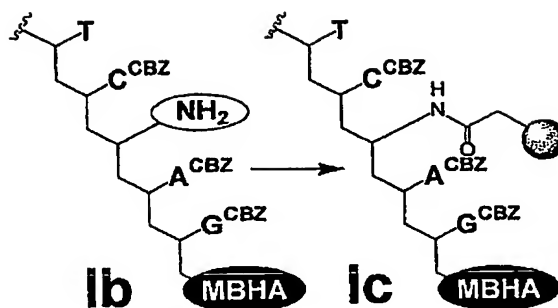
次に、【化26】に関わる製造工程のうち、下図

## 【化29】



に示すように、ピペリジン処理によって Fmoc 基を選択的に脱保護してアミノ基とし、Ib を得て、さらに、下図

## 【化30】



に示すように、該 I b の前記アミノ基に遊離カルボン酸を有する機能性分子を脱水縮合して I c を得る。

前記カルボン酸として特に制限はないが、反応性の点においては脂肪族カルボン酸が芳香族カルボン酸を上回るため、脂肪族カルボン酸を用いると製造の効率が高く好ましい。

## 【0064】

また、ピペリジン処理による Fmoc 基の脱保護は、ある程度の時間をかけることによって好適に行われる。特に、20～40分が好適であり、最も好適には30分であった。

縮合剤の種類に特に制限はなく、前記 PNA 鎖の縮合と同様に、HATU、HBTU および BOP 等の一般的な縮合剤が用いられる。

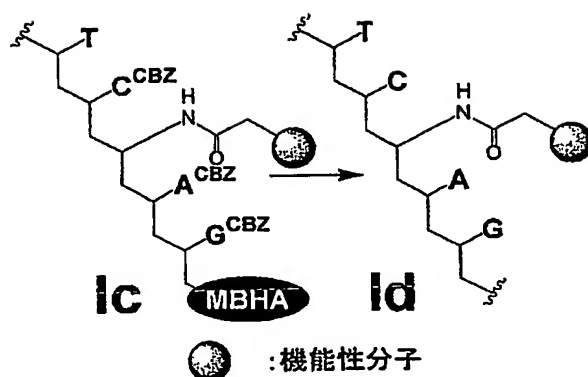
## 【0065】

なお、機能性分子の導入は、Boc-リジン (Fmoc) -OH を縮合した後、直ちに行ってもよく、あるいは、Boc-リジン (Fmoc) -OH を含む全ての PNA モノマーユニットを逐次縮合した後に行ってもよい。

## 【0066】

最後に、【化26】に関わる製造工程のうち、下図

【化31】



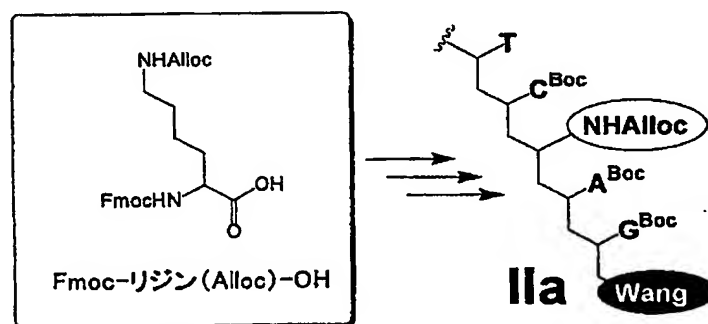
に示すように、担体レジンからの切り出しと Z 基の脱保護を同時に行うことによって、目的とする PNA オリゴマー Id を得る。

切り出しおよび脱保護は、Fmoc 基の脱保護の後に行われる限りにおいてはその条件に特に制限はない。例えば、TFA/TFMSA/p-Cresol/Thioanisole=60/25/10/10 のような一般的な条件において好適に行われる。

【0067】

次に、【化27】に関わる製造工程のうち、下図

【化32】



に示すように、Fmoc-リジン (Alloc)-OH を用いて、オリゴマー IIa を合成する。具的には、Boc 基等で保護されたアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを有する PNA モノマーユニットを、前駆体的 PNA モノマーユニットと反応させ、Fmoc 法用固相担体を用いて PNA 鎖を逐次縮合・伸長せしめる。

【0068】

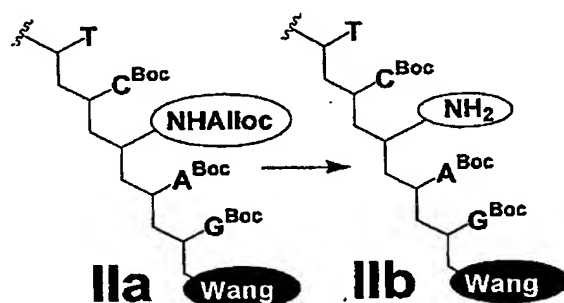
PNA鎖の縮合においては、予めFmoc基を脱離しておく必要があるが、その方法に制限はなく、一般的な方法が用いられる。それに続く縮合には、HATU、HBTUおよびBOP等の一般的な縮合剤が用いられる。

また、固相担体に関しては、Fmoc法用のものであれば特に制限はないが、特にWangが好適に用いられる。

### 【0069】

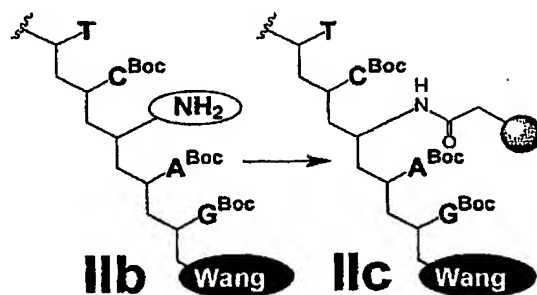
次に、【化27】に関わる製造工程のうち、下図

### 【化33】



に示すように、亜鉛酢酸溶液処理によってFmoc基を選択的に脱保護してアミノ基とし、IIbを得て、さらに、下図

### 【化34】



に示すように、該IIbの前記アミノ基に遊離カルボン酸を有する機能性分子を脱水縮合してIIcを得る。

前記カルボン酸として特に制限はないが、反応性の点においては脂肪族カルボン酸が芳香族カルボン酸を上回るため、脂肪族カルボン酸を用いると製造の効率が高く好ましい。

### 【0070】

また、亜鉛酢酸溶液処理による A l l o c 基の脱保護は、ある程度の時間をかけることによって好適に行われる。10分～1時間が好適であった。

縮合剤の種類に特に制限はなく、前記 P N A 鎖の縮合と同様に、H A T U、H B T U および B O P 等の一般的な縮合剤が用いられる。

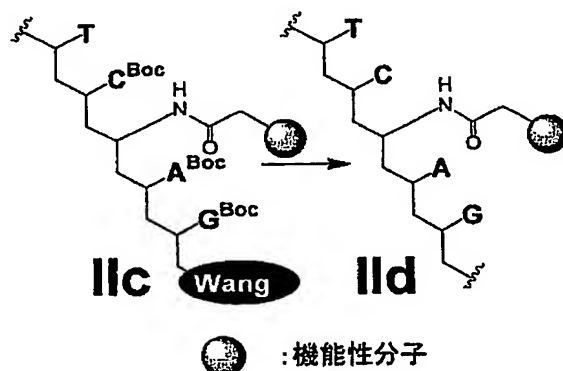
#### 【0071】

なお、機能性分子の導入は、F m o c - リジン (A l l o c) - O H を縮合した後、直ちに行ってもよく、あるいは、F m o c - リジン (A l l o c) - O H を含む全ての P N A モノマーユニットを逐次縮合した後に行ってもよい。

#### 【0072】

最後に、【化27】に関わる製造工程のうち、下図

#### 【化35】



に示すように、担体レジンからの切り出しと B o c 基の脱保護を同時に行うことによって、目的とする P N A オリゴマー I I d を得る。

切り出しおよび脱保護は、F m o c 基の脱保護の後に行われる限りにおいては、その条件に特に制限はない。例えば、T F A / p - C r e s o l = 95 / 5 のような一般的な条件において好適に行われる。

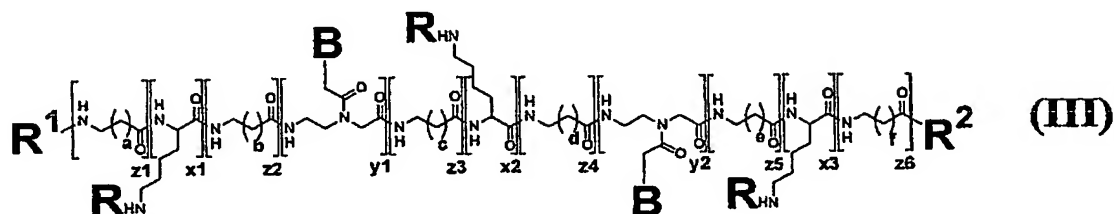
#### 【0073】

上記のように、本発明による方法においては、従来の機能性モノマー合成に用いる活性エステル化の合成を要する方法とは異なり、機能性分子をそのまま利用できる。また一旦 I I a を合成した後に種々の機能性分子が導入可能であるため、従来困難であった高速かつ多様な並列 P N A プローブ合成が可能である。

#### 【0074】

Boc-リジン (Fmoc)-OH 或いは Fmoc-リジン (Alloc)-OH と PNA 鎖を有する分子との反応を含む本発明による方法によれば、下記一般式 (III)

【化 36】



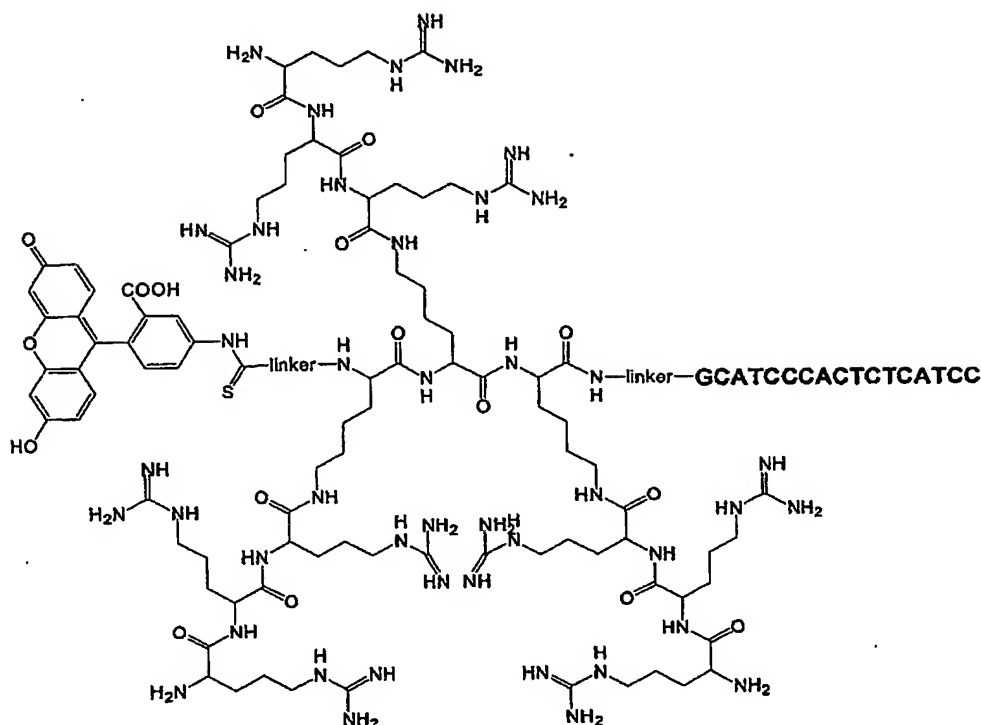
(式中、B は、互いに独立し、同一または異なって、アデニン、グアニン、シトシンまたはチミンであり、R は、互いに独立し、同一または異なって、Fmoc 基または機能性カルボン酸誘導体であり、 $R^1$  は、水素原子または機能性カルボン酸誘導体であり、 $R^2$  は、水素原子、アミノ基、水酸基、チオール基を含む誘導体または機能性カルボン酸誘導体であり、 $a \sim f$  は  $0 \sim \infty$  の整数であり、 $X_1 \sim X_3$ 、 $Y_1$ 、 $Y_2$  および  $Z_1 \sim Z_6$  はいずれも 0 以上の整数であり、 $X_1 + X_2 + X_3 \geq 0$  であり、 $Y_1 + Y_2 > 0$  であり、 $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 \geq 0$  である。ただし、 $X_1 + X_2 + X_3$  および  $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5$  が同時に 0 であることはなく、 $X_1 + X_2 + X_3 = 0$  の場合、 $R^1$  は機能性カルボン酸誘導体である。) で表される化合物において、 $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 = 0$  であり、 $R^1$  が水素原子である化合物を挙げることができる。

【0075】

また、前記一般式 (III) で表される化合物において、複数の機能性分子が導入されたものとして、例えば、R または  $R^1$  が細胞膜透過性機能分子誘導体であるものが好適に合成される。このような化合物は、典型的には、R が細胞膜透過性機能分子誘導体等であり、 $R^1$  が光機能性分子等の機能性カルボン酸誘導体等であるもの、すなわち、末端部を含む複数部位に機能性分子が導入され、それらによって複数の機能が付与された化合物である。このような化合物は、例えば下記のように模式化することができる。



## 【化 37】



## 【0076】

このような化合物は、例えば前記一般式 (I I I) において、 $X_1 = Z_1 = Z_2 = 1$  であり、かつ  $Y_1 \geq 2$  である化合物である。このような化合物は合成のしやすさおよび合成コストの面等において好適である。

上記化合物において、 $a$ 、 $b$  および  $f$  はそれぞれ 0 ～ 10 の整数であれば特に限定されないが、例えば  $a \leq 6$  であり、 $b \leq 4$  であり、 $f \leq 6$  であるものであっても、合成上および実用上のいずれにおいても支障はない。

## 【0077】

リンカー部位を導入することによって、個々の機能性部位および塩基配列認識領域の干渉を防ぎ、分子の機能をより確実なものにすることができる。本明細書における PNA、PNA モノマーおよび PNA オリゴマーの語には、リンカー部位をその末端および／または内部に含むものも包含される。

これらの部位または領域間の相互干渉を防ぐための部位としては、前記リンカー部位のみならず、一般式 (I I I) における  $f \sim h$  を、所望に応じて選択することによっても可能である。

リンカー部位を構成する基としては、直鎖状または分枝状の炭化水素およびそれらのエーテル体等が挙げられるが、直鎖状炭化水素基は導入の容易さおよびコストなどの面から好適であり、特に炭素数1～6の直鎖状炭化水素基が好適である。また、エーテル体は、その汎用性において好適である。

#### 【0078】

前記複数の機能性分子が導入された化合物は、例えばKoch, T.; Hansen, H. F. ;

Andersen, P.; Larsen, T.; Batz, H.G.; Otteson, K.; Ørum, H. *J. Peptide Res.* **1997**, *49*, 80-88. を利用して好適に合成される。

塩基配列認識部位は、市販の各種PNAモノマーを用いて固相合成によりオリゴマー化することができる。リンカー部位には、市販のBoc-7-アミノヘプタン酸、Boc-6-アミノカプロン酸等を用いることができる。

#### 【0079】

一般式(III)の機能性分子として光機能性分子を導入すれば、蛍光標識することが可能であり、かつ他の機能も有する化合物を合成することができる。このような蛍光標識部位として、市販のCy3、Cy5、Bodipy、pyrene、naphthalimide、naphthalaldimide、FAM、FITC、ROX、TAMRAまたはDabcyl等の市販の活性エステル型蛍光標識化合物を用いて、多様な蛍光発光波長を選択することが可能であるが、導入される蛍光標識化合物はこれらに限定されるものではない。

#### 【0080】

本発明の化合物に導入し得る他の機能性の例としては、膜透過性機能が挙げられる。このような膜透過性機能部位は、前回特許前記一般式(III)で表される化合物を用いることにより、同様に導入することができる。膜透過性を向上させることができる機能性分子としてアルギニンが挙げられるが、リシンおよびセリン等の他の水溶性アミノ酸も好適に用いることができる。

#### 【0081】

また、Boc-リジン(Fmoc)-OH或いはFmoc-リジン(Alloc)-OHを利用することによって、複数のアミノ酸を導入することも可能で

ある。その合成例は実施例 1 に示した。しかしながら、上記化合物は本発明による膜透過性機能を有する蛍光 PNA プロープのモデル化合物であり、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0082】

これらのプロープの特徴は、「全て PNA 型になっているので、完全な酵素耐性を有すること」である。すなわち、これまでの膜透過性機能を有するプロープは、PNA と膜透過性機能を有するペプチド鎖あるいはリン脂質を共有結合させたものが主流であったが、これらの既知のプロープは優れた膜透過性機能を有するものの、一旦細胞内に入ると酵素群によりペプチド鎖あるいはリン脂質が分解されることが予想される。したがって、これらは、ターゲットを認識していない分解を受けたプロープを洗浄過程で完全に取り除くことができないという欠点を有する。

#### 【0083】

これに対して、今回設計したプロープは、細胞内においても酵素分解を受けなため、ターゲットを認識していないプロープは洗浄過程で完全に取り除かれるため、正確な遺伝子発現量の定量を可能とするものである。

なお、これらの機能性を有する化合物以外にも、ラクトースやトリスエックス等の臓器選択機能性分子、タナチンやセクロピン等の殺菌機能性分子およびビオローゲン等の分子認識機能性分子、N-メチルヒドロキサム酸等の分子破壊性機能分子等も本発明によれば制限なく導入することが可能であり、そのような化合物を、大量に低コストで実用に供することが可能になる。

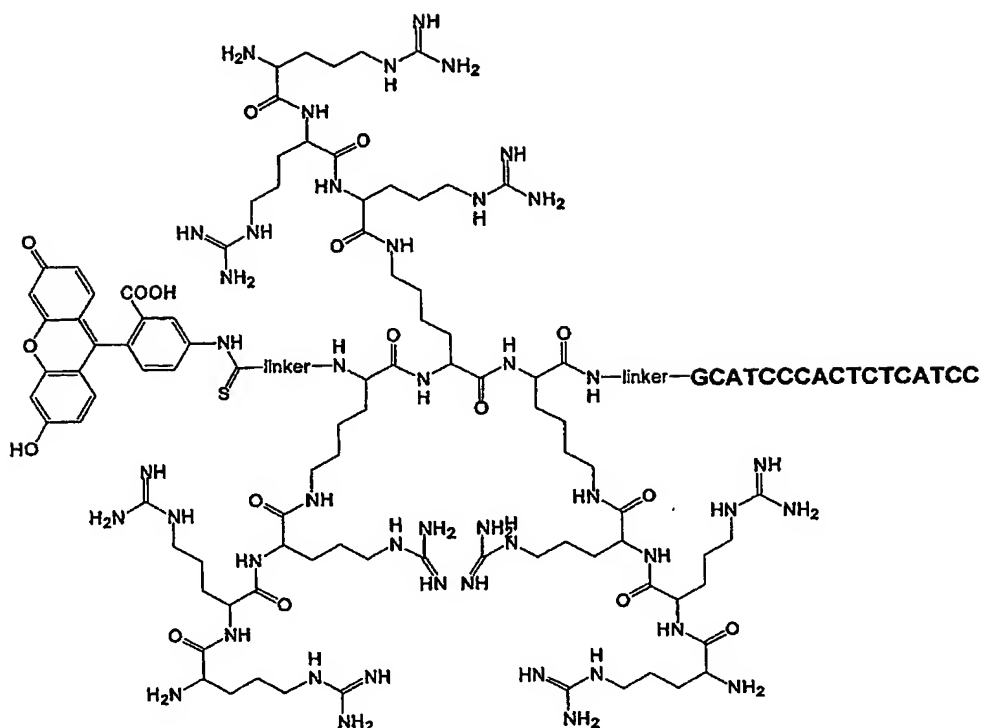
#### 【0084】

##### 【実施例】

以下に実施例を用いて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれに限られるものではない。

(実施例 1) 膜透過性機能を有する蛍光 PNA プロープの合成

## 【化38】



標準的Boc法 (cf. Koch, T.; Hansen, H. F.; Andersen, P.; Larsen, T.; Bat

z, H.G.; Otteson, K.; Ørum, H. *J. Peptide Res.* 1997, 49, 80-88.) に従い、まず、固相担体MBHA (50 mg) にチミンPNAモノマーユニット (7.7 mg、20 mmol)、縮合剤HBTU (7.6 mg、20 mmol) とDIEA (3.5 mL、20 mL) を用いて逐次伸長反応を行った (塩基配列認識領域の設計)。

次いで、リンカー用  $\omega$ -アミノ酸-Boc-7-aminoheptanoic Acid (5.2 mg、20 mmol)、Fmoc-Ahx-BocPNA-OH (10.0 mg、20 mmol) と再度Boc-7-aminoheptanoic Acidを、縮合剤HBTU (7.6 mg、20 mmol) とDIEA (3.5 mg、20 mmol) を用いて順次縮合させた (リンカー部位と膜透過性機能領域の設計)。

全てのユニットを逐次縮合した後、ピペリジン処理 (20% piperidine in DMF、室温3分) してFmoc基を脱保護した。次いで、機能性

カルボン酸誘導体として天然型Fmoc-Arg(Mts)-OH(23.1mg、40mmol)を縮合剤HBTU(15.2mg、40mmol)とDIEA(7.0mL、40mmol)を用いて縮合し目的の位置に機能性分子を導入した(膜透過性機能の導入)。

これをピペリジン処理(20%piperidine in DMF、室温3分)してFmoc基を脱保護した後、再度天然型Fmoc-Arg(Mts)-OH(23.1mg、40mmol)を縮合剤HBTU(15.2mg、40mmol)とDIEA(7.0mL、40mmol)を用いて縮合し目的の位置に機能性分子を導入した。これをもう一度繰り返した(膜透過性機能の追加導入)。

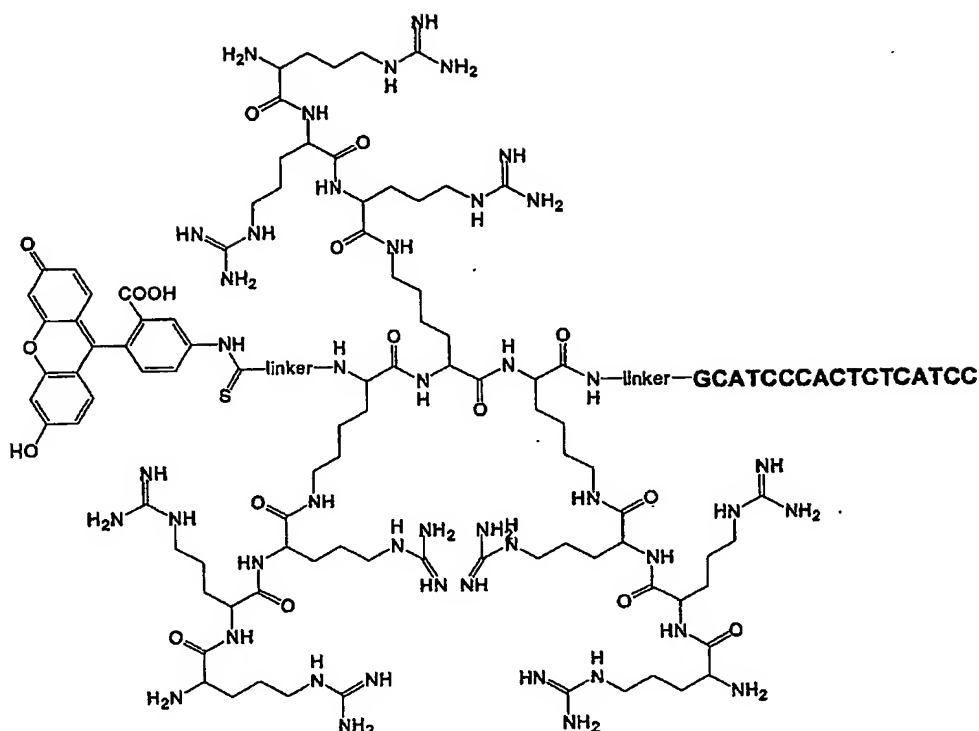
。

TFA処理(95%TFA/5%*m*-cresol)によりBoc基を脱保護した後、FITC(9.3mg、25mg)をDIEA(17.4mg、100mmol)存在下、室温で12時間攪拌し蛍光標識化した(蛍光標識部位の設計)。

最後にピペリジン処理(20%piperidine in D肝、室温3分)して残るFmoc基を脱保護した後、常法(TFA/TFMSA/*p*-cresol/*thioanisol*=60/25/10/10)により固相担体からの切り出しを行い、後処理して、目的物を得た。MALDI-TOF MS: calcd. 6373.0231 (M+H<sup>+</sup>)。

(実施例2) 膜透過性機能を有する蛍光PNAプローブの合成

## 【化39】



標準的Boc法 (cf. Koch, T.; Hansen, H. F.; Andersen, P.; Larsen, T.; Bat

z, H.G.; Otteson, K.; Ørum, H. *J. Peptide Res.* 1997, 49, 80-88.) に従い、まず、固相担体MBHA (50 mg) にチミンPNAモノマーユニット (7.7 mg、20 mmol)、縮合剤HBTU (7.6 mg、20 mmol) とDIEA (3.5 mL、20 mL) を用いて逐次伸長反応を行った (塩基配列認識領域の設計)。

次いで、リンカー用  $\omega$ -アミノ酸-Boc-7-aminoheptanoic Acid (5.2 mg、20 mmol)、Fmoc-Ahx-BocPNA-OH (10.0 mg、20 mmol) と再度Boc-7-aminoheptanoic Acidを、縮合剤HBTU (7.6 mg、20 mmol) とDIEA (3.5 mg、20 mmol) を用いて順次縮合させた (リンカー部位と膜透過性機能領域の設計)。

全てのユニットを逐次縮合した後、ピペリジン処理 (20% piperidine in DMF、室温3分) してFmoc基を脱保護した。次いで、機能的

カルボン酸誘導体として非天然型 Fmoc-Arg(Mts)-OH (23.1 mg、40 mmol) を縮合剤 HBTU (15.2 mg、40 mmol) と DIEA (7.0 mL、40 mmol) を用いて縮合し目的の位置に機能性分子を導入した (膜透過性機能の導入)。

これをピペリジン処理 (20% piperidine in DMF、室温 3 分) して Fmoc 基を脱保護した後、再度非天然型 Fmoc-Arg(Mts)-OH (23.1 mg、40 mmol) を縮合剤 HBTU (15.2 mg、40 mmol) と DIEA (7.0 mL、40 mmol) を用いて縮合し目的の位置に機能性分子を導入した。これをもう一度繰り返した (膜透過性機能の追加導入)。

TFA 処理 (95% TFA/5% m-cresol) により Boc 基を脱保護した後、FITC (9.3 mg、25 mg) を DIEA (17.4 mg、100 mmol) 存在下、室温で 12 時間攪拌し蛍光標識化した (蛍光標識部位の設計)。

最後にピペリジン処理 (2 当 piperidine in D 肝、室温 3 分) して残る Fmoc 基を脱保護した後、常法 (TFA/TFMSA/p-cresol/thioanisole = 60/25/10/10) により固相担体からの切り出しを行い、後処理して、目的物を得た。MALDI-TOF MS: calcd. 6373.0231 (M+H<sup>+</sup>)。

【0085】

#### 【発明の効果】

本発明によれば、光機能性分子に限定されることない多種多様な機能性分子を、PNA 中に容易に導入することができ、多種多様な機能性分子を PNA 中に容易かつ効率的に導入することができ、遺伝子治療などに用いられる種々の PNA の構築が可能になる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

DNA と PNA の構造および荷電の状況の違いを表す図である。

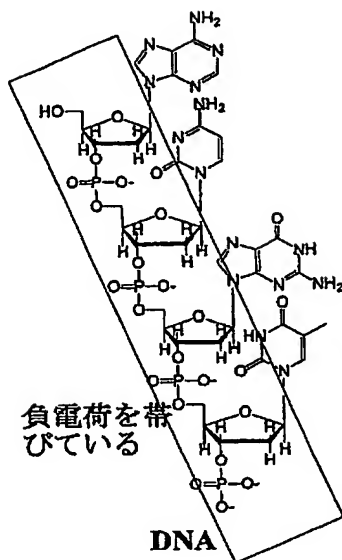
##### 【図 2】

2 種類 の P N A モ ノ マ ー ユ ニ ッ ト の 構 造 を 表 す 図 で あ る 。

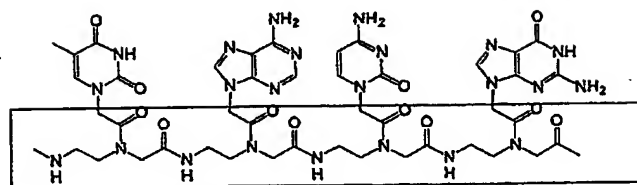


【書類名】 図面

【図 1】

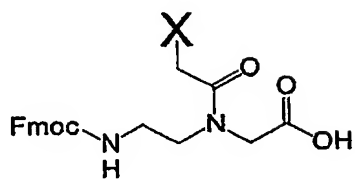


ペプチド核酸 (PNA)

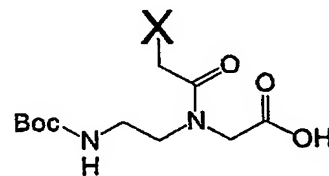


正にも負にも帯電していない

【図 2】



Fmoc型PNAモノマーユニット



Boc型PNAモノマーユニット

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コストパフォーマンスに優れ、かつ機能性分子を超高速に導入することができる、機能性PNAの新規合成方法およびそれに用いる化合物の提供。

【解決手段】 機能性PNAオリゴマーを製造する方法であって、保護基によって保護されたアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを有するPNAモノマーユニットを、Bocリジン(Fmoc)-OH或いはFmoc-リジン(Alloc)-OHと反応させてPNAオリゴマーを合成した後、該PNAオリゴマーに遊離カルボン酸を有する機能性分子を導入し、さらに前記保護基の脱保護を行うことを含む、前記方法、当該方法によって合成される化合物および前駆体的PNAモノマーユニットとして機能するBocリジン(Fmoc)-OH或いはFmoc-リジン(Alloc)-OH。

【選択図】 図2

【書類名】 出願人名義変更届  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2003-144152  
【承継人】  
【識別番号】 503280961  
【氏名又は名称】 株式会社クレディアジャパン  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100084696  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 赤尾 直人  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 054313  
【納付金額】 4,200円

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-144152
受付番号	50400050551
書類名	出願人名義変更届
担当官	兼崎 貞雄 6996
作成日	平成16年 5月26日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】	平成16年 1月14日
【承継人】	
【識別番号】	503280961
【住所又は居所】	京都府相楽郡精華町光台一丁目7番地 けいはんなプラザ ラボ棟
【氏名又は名称】	株式会社クレディアジャパン
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100084696
【住所又は居所】	東京都文京区湯島4丁目8番1-402号 赤尾法律特許事務所
【氏名又は名称】	赤尾 直人

特願 2003-144152

出願人履歴情報

識別番号

[501368735]

1. 変更年月日

2001年 9月19日

[変更理由]

新規登録

住 所

千葉県流山市江戸川台西3丁目31番地1号 エステート江戸

川台8棟307号

氏 名

池田 壽文

特願 2003-144152

出願人履歴情報

識別番号

[503280961]

1. 変更年月日

2003年 8月 4日

[変更理由]

新規登録

住所

京都府相楽郡精華町光台一丁目7番地 けいはんなプラザ ラ  
ボ棟

氏名

株式会社クレディアジャパン

## 第VIII欄 (iv) 発明者である旨の申立て (米国を指定国とする場合)

申立ては実施規則第214号に規定する以下の標準文書を使用して作成しなければならない。第VIII欄と同欄(i)～(v)の備考の総論部分、及び本頁に特有の事項について第VIII欄(iv)の備考を参照。この欄を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

発明者である旨の申立て (規則 4.17(iv)及び 51 の 2.1(a)(iv))  
(米国を指定国とする場合)

私は、特許請求の範囲に記載され、かつ特許が求められている対象に関して、自らが最初、最先かつ唯一の発明者である (発明者が1名しか記載されていない場合) か、あるいは共同発明者である (複数の発明者が記載されている場合) と信じていることを、ここに申し立てる。

本申立ては、本書がその一部をなす国際出願を対象としたものである (出願時に申立てを提出する場合)。

本申立ては、国際出願 PCT/\_\_\_\_\_ を対象としたものである (規則 26 の 3 に従って申立てを提出する場合)。

私は、特許請求の範囲を含め、上記国際出願を検討し、かつ内容を理解していることを、ここに表明する。私は、PCT 規則 4.10 の規定に従い、上記出願の願書において主張する優先権を特定し、かつ、「先の出願」という見出しの下に、出願番号、国名又は世界貿易機関の加盟国名、出願日、出願月、出願年を記載することで、米国以外の少なくとも一国を指定している PCT 国際出願を含め、優先権を主張する本出願の出願日より前の出願日を有する、米国以外の国で出願された特許又は発明証の出願をすべて特定している。

先の出願:

私は、連邦規則法典第 37 編規則 1.56 (37 C.F.R. § 1.56) に定義された特許性に関し重要であると知った情報について開示義務があることを、ここに承認する。さらに、一部継続出願である場合、先の出願の日から一部継続出願の PCT 国際出願日までの間に入手可能になった重要な情報について開示義務があることを承認する。

私は、表明された私自身の知識に基づく陳述が真実であり、かつ情報と信念に関する陳述が真実であると信じていることをここに申し立てる。さらに、故意に虚偽の陳述などを行った場合は、米国法典第 18 編第 1001 条に基づき、罰金、拘禁、又はその両方により処罰され、またそのような故意による虚偽の陳述は、本出願又はそれに対して与えられるいかなる特許についても、その有効性を危うくすることを理解した上で陳述が行われたことを、ここに申し立てる。

氏名: 池田 壽文

住所: 流山市 日本国

(都市名、米国の州名 (該当する場合) 又は国名)

郵便のあて名: 〒270-0115 日本国千葉県流山市江戸川台西3丁目31番地1号

エステート江戸川台8棟307号

国籍: 日本国 JAPAN

発明者の署名: 三世 田 壽文  
(国際出願の願書に発明者の署名がない場合や、規則 26 の 3 に基づいて国際出願の出願後に申立ての補充や追加がなされた場合。署名は代理人ではなく、発明者のものでなければならない。)

日付: 2004. 4. 13  
(国際出願の願書に発明者の署名がない場合や、規則 26 の 3 に基づいて国際出願の出願後に申立ての補充や追加がなされた場合)

氏名: 外崎 円

住所: 春日部市 日本国

(都市名、米国の州名 (該当する場合) 又は国名)

郵便のあて名: 〒344-0054 日本国埼玉県春日部市浜川戸1丁目14番地4

国籍: 日本国 JAPAN

発明者の署名: 外崎 円  
(国際出願の願書に発明者の署名がない場合や、規則 26 の 3 に基づいて国際出願の出願後に申立ての補充や追加がなされた場合。署名は代理人ではなく、発明者のものでなければならない。)

日付: 2004. 4. 13  
(国際出願の願書に発明者の署名がない場合や、規則 26 の 3 に基づいて国際出願の出願後に申立ての補充や追加がなされた場合)

☐ この申立ての続葉として「第VIII欄(iv)の続き」がある